บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาพัฒนาการของดอกและหัวของกล้วยไม้ดินครั้งนี้ดำเนินการกับกล้วยไม้ดิน 5 ชนิด ได้แก่ **เอื้องกลีบม้วน เอื้องหางกระรอก เอื้องฉัตรมรกต เอื้องมรกต** และ **สิกุนคล** วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งวิธีการดำเนินการมีดังต่อไปนี้

1. การเตรียมพืชทดลอง

การเตรียมพืชทดลองทั้ง 5 ชนิด เพื่อศึกษา**พัฒนาการของดอก**และเพื่อศึกษา**พัฒนาการของหัว**นั้น ใช้วิธีการเตรียมในลักษณะเดียวกัน คือ ปลูกต้นพืชจากหัวซึ่งมีขนาดที่ให้ดอกได้ คือ เอื้องกลีบม้วนมีเส้นรอบวง 7.8 ถึง 17.0 ซม เอื้องหางกระรอก13.5 ถึง 21.8 ซม เอื้องฉัตรมรกต 11.3 ถึง 21.9 ซม เอื้องมรกต 7.5 ถึง 16.5 ซม และสิกุนคล 10.6 ถึง 20.4 ซม ปลูกต้นพืชแต่ละชนิดจำนวน 150 ต้น ในแต่ละการศึกษา โดยปลูกหัวลงในกระถางขนาด 6 นิ้ว ซึ่งบรรจุวัสดุปลูก ได้แก่ ดิน และใบไม้แห้งในอัตราส่วน 1 : 1 เลี้ยงต้นพืชไว้ใต้ร่มเงาของต้นไม้ใหญ่ภายในแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ป่าภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

2. การศึกษาพัฒนาการของดอก

การศึกษาพัฒนาการของดอกของพืชทดลองแต่ละชนิดจากต้นพืชที่ปลูกเลี้ยงไว้ดังบรรยายใน**ข้อ 1** เป็นการศึกษาการเจริญและพัฒนาของช่อดอกและดอกย่อย โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุดเจริญปลายยอดของต้นพืชเป็นช่วง ๆ ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโตของต้นพืชไปจนกระทั่งจุดเจริญดังกล่าวมีการเปลี่ยนช่วงของการเจริญเติบโต(growth phase) จากการเจริญทางใบ (vegetative phase) ไปเป็นการเจริญทางดอก(reproductive phase) เรื่อยไปจนกระทั่งต้นพืชสร้างตาดอกและมีการพัฒนาช่อดอก จากช่อดอกอ่อนที่มีดอกย่อยอยู่ในระยะกำเนิดดอกซึ่งต่อมามีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ของดอกไปจนถึงระยะที่ช่อดอกเจริญและพัฒนาไปเป็นช่อดอกในระยะเจริญพันธุ์ที่มีดอกย่อยทยอยกันบานและต่อมาติดฝักในสภาพธรรมชาติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกการเจริญและพัฒนาการของช่อดอกและดอกย่อยดำเนินการ 2 วิธี คือ

2.1 บันทึกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผ่านกล้องจุลทรรศน์ 2 ตาหรือศึกษาด้วยตาเปล่า ตามระยะของการเจริญและพัฒนาของช่อดอก แล้วบันทึกลักษณะด้วยการวาดภาพลายเส้นแสดงส่วนต่าง ๆ ของช่อดอกและดอกย่อยในแต่ละระยะของพัฒนาการ ตามหลักการวาดภาพทางพฤกษศาสตร์ซึ่งเสนอไว้โดย ลลิตา (2548)

2.2 บันทึกจากลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ การศึกษาในข้อนี้ทำโดยการเก็บตัวอย่างของจุดเจริญปลายยอดและตาดอกขนาดต่าง ๆ ของพืชทดลองตามระยะของการเจริญและพัฒนาให้สอดคล้องกับการทดลองที่ 1 แล้วนำตัวอย่างที่เก็บมานั้นไปศึกษากายวิภาคศาสตร์โดยนำเนื้อเยื่อตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนของการเตรียมเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นส่วนที่ตัดตามขวางหรือตามยาว แล้วตรึงแบบถาวรไว้บนแผ่นกระจกสไลด์ตามเทคนิคและวิธีพื้นฐานของการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินตามกรรมวิธีที่เสนอไว้โดยJohansen (1940) โดยที่มีการดัดแปลงเทคนิคในบางขั้นตอนของการศึกษาให้เหมาะสมกับสภาพของเนื้อเยื่อที่เก็บมา เมื่อได้สไลด์ถาวรจึงตรวจสอบและศึกษา เนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ก่อนที่จะนำผลที่ได้มาวิเคราะห์พัฒนาการของช่อดอกและดอกย่อยตามแนวทางที่เสนอไว้โดย Le Nard and De Hertogh (1993)

การเตรียมสไลด์ถาวรของ เนื้อเยื่อพืชทดลอง มีขั้นตอน การเตรียมตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ ดังนี้

2.2.1 เก็บตัวอย่างสดตามที่วางแผนไว้มาแช่ลงในน้ำยา FAA (formalin-acetic acid - alcohol) ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว นำขวดเหล่านั้นไปใส่ในเครื่องดูดอากาศเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากเนื้อเยื่อและให้น้ำยาแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชอย่างทั่วถึง ก่อนเดินเครื่อง เปิดฝาของทุกขวดออก ปล่อยให้มีการดูดอากาศออกจนกระทั่งตัวอย่างเหล่านั้นอยู่ในสภาพไร้อากาศ จากนั้นจึงปิดฝาขวดให้แน่นและเก็บขวดตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

น้ำยา FAA ซึ่งทำหน้าที่ ในการฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเ ซลล์ (killing and fixing solution) ที่ใช้ในการศึกษานี้มีส่วนผสม ดังนี้

95% ethyl alcohol	**50**	**มิลลิลิตร (มล)**
glacial acetic acid	**5**	**มล**
formalin	**10**	**มล**
น้ำกลั่น	**35**	**มล**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 ถ่ายเนื้อเยื่อออกจากน้ำยา FAA มาใส่ลงในแอลกอฮอล์เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อโดยให้ผ่านน้ำยาที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไปหาสูง คือ จาก 50 เปอร์เซ็นต์ (%) ไปเป็น 70, 85, 95 และ 100% ตามลำดับ อันเป็นวิธีการการดึงน้ำออกจากเซลล์อย่างค่อยเป็นค่อยไปเพื่อไม่ให้เซลล์เหี่ยวและเสียรูปทรงดั้งเดิม แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์เป็นส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol และ tertiary butyl alcohol (TBA) โดยที่น้ำยาที่มีแอลกอฮอล์ในความเข้มข้นแต่ละระดับจะมีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิดแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับน้ำยาระดับที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 100% (ระดับ 5) นั้นมีสี erythrosin ผสมอยู่เล็กน้อย เพียงพอเพื่อให้เกิดสีแดงในน้ำยาเพื่อว่าเมื่อแช่เนื้อเยื่อลงไปสีจะติดที่ผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อหรือติดลึกเข้าไปถึงด้านใน ซึ่งเนื้อเยื่อที่ติดสีจะช่วยให้การฝังเนื้อเยื่อนั้นในพาราฟินทำได้สะดวกและจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในพาราฟินได้ง่ายขึ้น นี้สีแดงของ erythrosin จะหลุดจากชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในขณะที่มีการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อระหว่างขั้นตอนของการย้อมสี

เมื่อผ่านเนื้อเยื่อในน้ำยาที่มีแอลกอฮอล์จนถึงระดับ 5 แล้วจึงถ่ายเนื้อเยื่อลงในขวดที่บรรจุ TBA บริสุทธิ์นานอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดค่อยถ่ายเนื้อเยื่อลงในขวดที่มีส่วนผสมของ TBA และพาราฟินเหลว (1 : 1) เพื่อให้เนื้อเยื่อพร้อมในการรับการซึมแทรกของพาราฟิน (paraffin infiltration) ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อเข้าสู่ขั้นตอนของการแทรกพาราฟินซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับยึดเนื้อเยื่อให้คงตัวในขั้นตอนของการตัดเนื้อเยื่อ

น้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์(dehydrating solution) ประกอบด้วยส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 3 ชนิดดังกล่าวแล้วข้างต้น โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวเจือจาง อัตราส่วนของส่วนผสมในน้ำยาจากระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ระดับ 1 ไปจนถึงระดับ 5 ตามวิธีของ Sass (1966) แสดงไว้ในตารางข้างล่างนี้ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้การดึงน้ำออกจากเซลล์ใช้เวลาระดับละไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของแอลกอฮอล์ในน้ำยาที่ใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์จากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง

ระดับ	เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์	95 % ethyl alcohol (มล)	absolute ethyl alcohol (มล)	tertiary butyl alcohol (มล)	น้ำกลั่น (มล)
1	50	40	-	10	50
2	70	50	-	20	30
3	85	50	-	35	15
4	95	45	-	55	-
5	100	-	25	75	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.3 ถ่ายเนื้อเยื่อที่ดึงน้ำออกหมดแล้วลงไปในขวดแก้วซึ่งบรรจุพาราฟินที่หลอมจนเหลวไว้แล้ว เปิดฝาขวดออก นำไปเก็บไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ56 °ซ นานประมาณ1 สัปดาห์ หรือมากกว่าเพื่อให้พาราฟินแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อจนเต็ม

2.2.4 นำเนื้อเยื่อมาฝังในสารตัวกลาง (embedding media) คือ พาราฟินในรูปของ Paraplast แล้วจัดเนื้อเยื่อให้อยู่ในตำแหน่งและระนาบที่ต้องการก่อนที่พาราฟินจะแข็งตัว

2.2.5 นำแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อฝังอยู่ไปตัดแต่งให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า โดยมีเนื้อเยื่อพืชอยู่ตรงกลาง แล้วนำมาติดกับแท่งไม้ซึ่งผ่านการต้มในพาราฟินจนแท่งไม้นั้นมีพาราฟินแทรกอยู่ในช่องว่างของเนื้อไม้และเคลือบผิวของแท่งไม้อยู่โดยรอบ จากนั้นนำแท่งไม้ไปติดไว้บนแป้นของเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบล้อหมุน (rotary microtome) ตัดเนื้อเยื่อตามยาวหรือตามขวางให้มีความหนา 13-15 ไมครอน ได้ชิ้นส่วนของพืชในพาราฟินออกมาเป็นแผ่นติดกันยาวในลักษณะของริบบิ้นหรือแถบพาราฟิน (paraffin ribbon)

2.2.6 นำแถบพาราฟินมาเลือกให้ได้ชิ้นส่วนที่ต้องการแล้วแยกแผ่นพาราฟินเหล่านั้นออก นำไปติดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดโดยใช้น้ำยาเหนียว(adhesive) ช่วยยึดเนื้อเยื่อพืชให้ติดกับแผ่นกระจกสไลด์ วางแผ่นกระจกสไลด์เหล่านั้นบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทิ้งไว้จนแผ่นชิ้นส่วนแห้งและติดแน่นกับแผ่นกระจกสไลด์

น้ำยายึดเนื้อเยื่อพืชสูตรเข้มข้น มีส่วนผสม ดังนี้

ไข่ขาว	**1**	**มล**
น้ำกลั่น	**49**	**มล**

เมื่อจะใช้จึงเจือจางน้ำยา 1 มล ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 50 มล

2.2.7 นำแผ่นกระจกสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อแล้วไป ย้อมสีแบบสีเดี่ยว (single stain) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้ สี Delafield's hematoxylin หรือย้อมสีแบบสีคู่ (double stain) ซึ่งในที่นี้ใช้สี Safranin และ Fast Green ส่วนผสมของสี ทั้ง 3 ชนิดแสดงในตารางที่ 3

ก่อนที่จะนำสไลด์ไปย้อมสีให้กับเนื้อเยื่อต้องละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อเสียก่อนโดยการแช่สไลด์ลงใน xylene บริสุทธิ์ จนเห็นว่าไม่มีเศษของพาราฟินติดอยู่บนสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของสารละลายสี Delafield's Hematoxylin, Safranin และ Fast Green

ชนิดของสี	สารเคมี	ปริมาณ
Delafield's hematoxylin	aluminium sulfate $[Al_2(SO_4)_3.16H_2O]$	400.00 มล
	hematoxylin $(C_{16}H_{14}O_6)$	4.00 กรัม
	95% ethyl alcohol	25.00 มล
	methyl alcohol	100.00 มล
	glycerol	100.00 มล
Safranin	safranin O $(C_{20}H_{19}N_4Cl)$	4.00 กรัม
	methyl cellosolve	200.00 มล
	95% ethyl alcohol	100.00 มล
	sodium acetate	4.00 กรัม
	formalin	8.00 มล
	น้ำกลั่น	100.00 มล
Fast Green	fast green FCF $(C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2)$	0.15 กรัม
	methyl cellosolve	100.00 มล
	absolute ethyl alcohol	100.00 มล
	clove oil	100.00 มล

2.2.8 ปิดแผ่นกระจกสไลด์ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์โดยใช้ Canada balsam เป็นตัวยึด ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้องหรือใช้ไฟจากหลอดไฟส่องจนแห้ง

2.2.9 ศึกษาเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วบันทึกภาพ

2.3 การวิเคราะห์ผลการศึกษา วิเคราะห์ปัจจัยทางกายภาพที่น่าจะมีผลต่อการสร้างดอกในสภาพบังคับจากข้อมูลทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวกับการสร้างดอกของพืชทดลองทั้ง 5 ชนิด จากการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 พร้อมทั้งประเมินความเป็นไปได้ในเชิงการปลูกเลี้ยงพืชทดลองให้ออกดอกนอกฤดู ตลอดจนการประเมินศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชทดลองให้มีคุณสมบัติที่ดึงดูดในเชิงการค้าเพื่อวางแนวทางของการวิจัยต่อเนื่องที่อาจจะมีตามมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การศึกษาพัฒนาการของหัว

การศึกษา **การสร้างและพัฒนาการของหัว** ของพืชทดลองทั้ง 5 ชนิดนั้นใช้ต้นพืชซึ่งเตรียมไว้เพื่อการศึกษาด้วยวิธีเดียวกันกับการศึกษาพัฒนาการของดอก

ดำเนินการศึกษาดังนี้

3.1 ติดตามการเปลี่ยนแปลงอันเกิดจากการแปรรูปของอวัยวะของต้นพืชจากสภาพที่เป็นอวัยวะปกติก่อนการลงหัวไปจนกระทั่งเกิดเป็นหัวใหม่ที่สมบูรณ์และพัฒนาแล้วอย่างเต็มที่ บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เกิดขึ้น ณ บริเวณที่เป็นจุดกำเนิดหัวหรือบริเวณที่มีการแปรรูปของอวัยวะที่เกี่ยวข้องพร้อมกับสังเกตและบันทึกการเปลี่ยนสภาพของหัวเก่าของต้นพืชต้นเดียวกันไปด้วย บันทึกภาพและวาดรูปลายเส้นประกอบการบันทึกผล

3.2 เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของหัว โดยเฉพาะเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการเกิดตาหรือมีการเปลี่ยนแปลงของตาตลอดช่วงเวลาที่หัวมีการเจริญและพัฒนา นำเนื้อเยื่อเหล่านั้นไปศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์โดยใช้วิธีการเตรียมสไลด์ถาวรดังที่ดำเนินการในข้อ 2.2

3.3 รวบรวมข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 นำไปวิเคราะห์เพื่อให้ได้แนวทางในการผลิตหัวพันธุ์ ตลอดจนการเก็บรักษาหัวพันธุ์ของพืชทดลองทั้ง 5 ชนิด ทั้งในสภาพปกติและสภาพบังคับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved